□보 문□

韓國土壤動物學會誌 5(1) : 39~46 (2000)
Korean Journal of Soil Zoology

지렁이 중장에서 분리한 Alkaline Phosphatase의 분포와 특성에 관한 연구

박희우 · 조성진 · 조표연 · 이명식 · 이규석* · 박순철
(중앙대학교 생명과학과, *관동대학교 의과대학 해부학교실)

Distribution and Some Properties of the Alkaline Phosphatase from the Midgut of the Earthworm, *Eisenia andrei*

Park, Hee Woo, Sung Jin Cho, Pyo Yun Cho, Myung Sik Lee, Kyu Seok Lee* and Soon Cheol Park
*(Department of Life Science, Chung-Ang University, *Department of Anatomy, Kwangong University College of Medicine)*

ABSTRACT

The distribution and some properties of alkaline phosphatase (ALP) were investigated in the midgut of the earthworm, *Eisenia andrei*. The ALP activity appeared to be highly polarized toward the luminal side of epithelium, with minor ALP activity in chloragogue tissue. The epithelial and chloragogeneous tissues contained approximately 85 and 15% of total intestinal ALP activity, respectively. The optimal temperature was approximately 37°C and isoelectricpoint was estimated to be 4. The treatment of neuraminidase and PtdIns-PLC failed to change the migration rate of ALPs. Also, these ALPs appeared to have a wide range of substrate specificity. The relationship between the properties and physiological significances of the midgut ALPs in *Eisenia andrei* was discussed.

Key words : Alkaline phosphatase, Earthworm, Midgut, Distribution, Characteristics

서 론

지렁이는 계통분류학상 하등동물과 고등동물의 중간에 위치하고 있는 환형동물문, 빈모강, 신빈모목에 속하는 동물로서 두 동물군의 특징을 함께 가지고 있는 동물이다. 지렁이는 최초의 육상동물로 생각되고 있으며, 토양 굴토성 동물(soil burrowing animal)로서 토양생태계에서 유기물질 순환에 매우 중요한 역할을 하고 있다.

Alkaline phosphatase (ALP, orthophosphoric monoester hydrolase, EC 3.1.3.1)는 거의 모든 동물 종의 다양한 조직에 다양한 상태로 존재하는 효소이다. 일반적으로 membrane-bound glycoprotein이나 일부 soluble form도 존재하고 2가 양이온(metal ion) 의존성 등의 특징을 가지고 있다. 또한 장, 신장 등과 같은 영양분의 대사나 흡수가 활발히 이루어지고 있는 기관에 많이 분포하고 있다. 기관-특이성(organ-specific) ALP, 배아-특이적(embryo-specific) ALP 등 여러 isoenzyme form이 알려져 있으며, 의학적으로도 응용되어 여러 병변 현상을 진단하는 수단으로 많이 이용되고 있다(Fishman 1974).

포유류에 있어서는 장(intestine), 간장(liver), 신장(kidney), 태반(placenta), 골격(bone) 특이성 ALP 등이 존재하며 각각 서로 다른 생화학적 특성을 나타내고 있다. 이러한 여러 isoenzyme form의 조직 및 생화학적 특이성은 각 isoenzyme이 서로 다른 조직에서 독특한 생리적 기능 또는 중요성을 가지고 있음을 나타낸다.

ALP의 생리적 기능에 관한 연구는 주로 세포내로의 물질이동이 다른 기관에 비해 상대적으로 활발한 장 또는 신장에서 이루어지고 있다. 사람의 장 ALP는 최적 pH (pH 10)보다 매우 낮은 생리적 pH (pH 7.4)에서 p-nitrophenyl phosphate와 더 높은 친화력을 가지고 있어서 phosphate binding protein의 역할을 할 가능성이 있는 것으로 보고되었다(Hirano 등 1985). 또한 흰쥐의 경우에는 장의 glucose 흡수와 phosphate 이동에 ALP가 연관되어 있다는 증거가 보고되었으며(Roubaty와 Portman 1988), ALP의 일반적인 역할로 알려져 있는 phosphoester hydrolase 활성 이외에 transphosphorylase 활성을 포함하고 있어, 이 활성이 직, 간접적으로 무기인(inorganic phosphate)과 calcium 수송에 연관되어 있을 것으로 추정하고 있다(Dupuis 등 1991). 그러

나 vanadate 또는 arsenate와 같은 억제제를 사용한 일련의 연구에서는 ALP 활성의 억제가 장에서 인의 수송을 억제하지 못하는 것으로 나타나서, 이 두 생화학적 반응은 서로 연관성이 없는 것으로 보고되기도 하였다. 신장의 ALP 기능에 관한 연구에 있어서는 이 효소가 피질의 brush border membrane에서 무기인 수송에 관여한다는 보고(Yusufi 등 1983)와 서로 연관성이 없다는 상반된 보고(Tenenhouse 등 1980)가 있다. 이 밖에도 연골(cartilage)의 ALP 기능에 대한 연구에서 ALP는 matrix vesicle의 phosphate 흡수와 연관되어 있는 것으로 생각되나, vanadate를 사용한 연구에서 ALP의 억제가 phosphate 흡수를 완전히 억제하지는 못하는 것으로 나타나 이 조직에 있어서는 ALP 이외의 다른 요소가 연관되어 있을 것으로 보고되었으며(Register와 Wuthier 1984), 근래에 이 조직에서 membrane-bound form이 아닌 soluble form이 정제 특성화되기도 하였다(Say 등 1991). 또한, 흰쥐 소장은 최소한 세 가지 형태의 ALP를 포함하고 있으며(Tojyo 1984), 닭(white leghorn)의 경우 세 가지 isoenzyme은 EDTA, heating, acid와 urea 등과 같은 억제인자에 서로 다르게 반응하는 것으로 보고되었다(Chang과 Moog 1972). 사람의 장의 ALP도 최소한 세 가지 형태의 isoenzyme을 포함하고 있으며, 이 중 한가지 형태의 isoenzyme 만이 neuraminidase에 의해 활성이 억제되는 것으로 나타났다(Mulivor 등 1978). 또한 여러 조직에서 기원한 각각의 ALP는 neuraminidase 처리에 각기 다르게 반응하며(William과 Linda 1988), 포유류의 장 ALP의 경우에는 phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PtdIns-PLC) 등의 처리에 의한 일련의 실험을 통해 glycosylphosphatidylinositol (GlcPtdIns)에 anchor되어 있다고 보고 되었다(Hoffmann-Blume 등 1991). 이러한 사실은 각 형태의 isoenzyme이 독특한 생화학적 특성을 가지고 있고, 각각의 형태가 독특한 생리적 역할을 하고 있음을 나타낸다.

지렁이 성체의 ALP에 관한 연구는 이 동물이 토양이나 포유류의 분비물을 섭취하여 그 안의 유기물을 분해, 흡수하는 특성상 장(intestine) ALP에 관한 연구가 주로 수행되어지고 있다.

지렁이의 장 ALP는 glycogen 분해(Prento 1987a), transmembrane transport (Dev와 Vyas 1972) 그리고 xenobiotics의 bioactivation (Park 등 1993) 등과 같은 여러 생화학 반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이 효소의 장내 분포는 종에 따라 매우 다양하게 나타나고 있다. Lumbricus terrestris에서는 chloragogue tissue가 전체 장 ALP 활성의 45%를 차지하고 있다(Prento 1987b). *Chloragogue tissue*는 지렁이 장의 최외각 조직으로 포유류의 간장에 해당하며, 아미노산 대사효소 및 지질 대사효소 특히, xenobiotics 대사효소를 다수 포함하고 있는 특수조직이므로 *L. terrestris*의 장 ALP는 주로 xenobiotics 대사에 관여하고 있는 것으로 추측되고 있다(Fisher와 Molnar 1992). *Barogaster annandalei*의 경우에는 장상피(intestinal epithelium)의 정상부위(apical portion)에 국한되어 ALP의 활성이 나타나고 있어서 상피세포를 통한 물질이동에 관여하고 있는 것으로 사료되고 있다(Dev와 Vyas 1972). 이와 같이 장 ALP의 분포 양상은 그 생리적 기능을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

지렁이 성체에 있어서 ALP의 생화학적 특성은 *Lumbricus terrestris*를 재료로 하여 Park 등(1990, 1992)에 의해 최적 pH, 최적 온도, Km, 억제제에 의한 영향 및 분자량 등 그 일부가 보고된 바 있으며, *Eisenia andrei*의 장 ALP에 관한 연구에 있어서는 최근 Park 등(1996)에 의해 isoenzyme 수가 보고되었을 뿐 생화학적 특성에 대한 연구는 매우 미진한 상태이다. ALP의 생화학적 특성은 적정 pH 및 온도, Km, Vmax, 분자량, 억제제의 효과, 2가 양이온 의존성 및 sulfhydryl기 의존성 등에 관한 연구가 주로 이루어지고 있으며(Houk와 Hardy, 1984; Soucek과 Vary 1984), 동물 종 및 그 기원에 따라 매우 다양한 양상을 나타내고 있다(Park 등 1992). 따라서 본 연구는 *Eisenia andrei*를 재료로 하여 장에서의 ALP 활성 분포와 분자량, 등전점(pI), 열안정성, neuraminidase와 PLC 처리에 대한 영향 및 기질 특이성 등 몇 가지 특성을 관찰하여 포유류를 비롯한 타종과 비교함으로써 대표적인 토양 무척추동물인 지렁이에서 중장의 ALP의 생리학적 중요성과 그 기능을 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 지렁이 (*Eisenia andrei*)의 배양

지렁이는 Park 등(1996)에 의한 방법으로 사육하였다. 낚시 미끼용 지렁이(*Eisenia andrei*)를 구입하여 다른 종에 속하는 지렁이를 제거한 후, 환대가 잘 발달된 성숙한 개체만을 선택하였다. 선택된 지렁이는 증류수로 수 차례 세척하였다. 배양시 사용한 토양은 배양토와 자연 비료를 1:1로 혼합하여 사용하였으며 15×20 cm의 플라스틱 용기에 넣어 23±1°C를 유지하며 암소에서 배양하였다. 배양 전에 토양은 선충류의 성장을 최소화하기 위하여 65°C 건조용 전기 oven에서 12시간 이상 건조시킨 후 사용하였다. 배양시 습도는 주기적으로 증류수를 공급하여 80% 이상을 유지하게 하고, food source로는 우분을 매일 토양 위에 공급하였다. 지렁이는 최소한 7일 이상 기초 배양한 후 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 지렁이는 장내 미생물의 영향을 최소화하기 위하여, 지렁이 생리식염수(25 mM NaCl, 2.5 mM K_2SO_4, 67.5 mM Na_2SO_4, 0.5 mM $MgSO_4$, 13.25 mM $CaCl_2$, 5 mM Tris, 2.7 mM glucose)로 적신 filter paper에서 24시간 배양하여 중장내 물질을 배출시킨 후 사용하였다.

2. 중장의 적출

지렁이의 중장을 적출하기 위하여 지렁이를 70% ethanol로 마취시킨 후 두부에서 미부로 절개하여 체절 33번-52번까지의 중장을 적출하였다.

3. ALP의 분리

중장 ALP는 Park 등(1996)에 의한 방법으로 분리하였다. 분리된 각 조직은 Glass-teflon homogenizer (Wheaton)로 균질액을 만든 후 13,000×g에서 30분간 원심분리(Jouan MR 18 22)하여 그 상층액만을 모으고, cold butanol (최종농도 20%)을 첨가하여 5분 간격으로 10초씩 혼합하며 60분간 배양하였다. 배양 후 13,000×g에서 60분간 원심분리하여 butanol층을 제거하고, 상층액만을 모아 cold acetone을 첨가하여 −10°C에서 10분간 배양하였다. 배양 후 13,000×g에서 5분간 원심분리하여 단백질을 침전시켜 이를 효소의 활성도 측정과 non-denaturing PAGE를 위한 효소원(enzyme source)으로 사용하였다. 위의 모든 과정은 4°C 이하를 유지하며 수행하였다.

4. ALP의 활성도 측정 및 단백질 정량

ALP의 활성도를 측정하기 위하여 0.1 M, pH 9.0 Tris-HCl 완충용액으로 용해한 효소원 100 μl에 기질 100 μl (10 mM p-Nitrophenyl phosphate)를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 그 후 0.1 M NaOH 1 ml을 첨가하여 반응을 멈추게 하고, 생성된 p-nitrophenol anion을 분광광도계(Beckman DU 600)로 400 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 측정하였다. 상기 조건에서 p-nitrophenol의 extinction coefficient는 1.2×10^4 cm^2/mole이었다.

단백질 정량은 Bradford (1976)의 방법에 따라 측정하였다. 이때 표준 단백질로 bovine serum albumin (Bio-Rad)을 사용하였다.

5. ALP의 조직화학적 관찰

중장내 ALP의 분포를 알아보기 위하여 조직화학적 방법을 이용하였다. 성체에서 중장을 적출하여 4% formaldehyde와 1% glutaraldehyde가 포함된 50 mM, pH 9.3 borate 완충용액에 4°C를 유지하며 10분간 1차 고정한 후 동일 완충용액에서 12시간 배양하고, 10% sucrose가 포함된 동일 borate 완충용액으로 세척하였다. 고정된 중장은 1 mm 길이로 절단하여 4°C에서 에탄올로 탈수시킨 후 파라핀에 포매하고 cryostat (Leica, CM 3000 V 2.1)을 이용하여 5 μm 두께로 초박절편을 만들었다. 제작된 절편은 chromalum gelatin으로 precoating된 glass slide 위에 mounting하고, 0.25% α-naphthyl phosphate와 0.05% diazonium salt가 포함된 50 mM, pH 9.3 borate 완충용액에서 30분간 배양하여 ALP enzyme product를 형성케 한 후 광학현미경(Olympus, VANOX-S)으로 관찰하였다.

6. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

non-denaturing PAGE는 Ornstein (1964)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. Separating gel (6%, 8×12×0.1 cm)과 stacking gel (4%)은 모두 2.6% crosslinker와 0.5% Triton X-100을 포함하였다. 분리한 중장 ALP는 0.5% Triton X-100이 포함된 sample buffer (80 mM, pH 6.8 Tris-HCl)에 용해하여 각각의 well마다 단백질의 농도가 약 20-50 μg/5 μl씩 되도록 loading하고, 최초 150 V에서 30분간 전기영동한 후 250 V에서 70분간 전기영동하였다.

전기영동이 끝난 후 ALP 부위를 확인하기 위하여 activity staining을 실시하였다. activity staining은 separating gel을 15 mM α-naphthyl phosphate (Sigma, USA)와 fast blue BB dye (1 mg/1 ml, Sigma, USA)를 포함하는 0.1 M, pH 9.0 Tris-HCl 완충용액 속에서 37°C를 유지하며 10분간 배양하여 실시하였다.

7. ALP의 부분 정제

상기 과정에 의해 확인된 ALP 부위만을 gel cutter로 조심스럽게 잘라 세절하고, 4°C, 30 mA에서 6시간 동안 Electro-Eluter (Bio-Rad)로 ALP를 회수하였다. 이때 사용된 elution 완충용액은 영동시 사용된 reservoir 완충용액과 동일한 것을 사용하였다. 회수된 ALP (전체용량 400 μl-500 μl)을 cold acetone으로 침전시켜 0.1% Triton X-100이 포함된 0.1 M, pH 9.0 Tris-HCl 완충용액 1 ml에 용해한 후 Sephacryl S-200 HR gel filtration column (1.6×35 cm)에 통과시켰다. 이때 유속은 20 ml/hr로 하였고, 분획당 1.5 ml씩 수집하여 각 분획의 효소 활성도를 측정한 후, 효소 활성이 높게 나타난 분획만을 실험에 사용하였다. 최종 부분정제도는 약 100배 정도였다.

8. 등전점 (isoelectric point, pI)의 측정

ALP의 등전점 측정은 추출한 효소원 5 mg을 전체 volume이 18 ml이 되도록 0.5% ampholyte (Bio-Rad, pH range 3-10)가 포함된 2차 증류수로 희석한 후, Rotofor Cell (Bio-Rad)을 사용하여 10 W에서 약 2시간 동안 분리한 후 각각의 분획을 수집하였다. 수집된 각 분획의 효소 활성도와 pH를 측정하여 최고 활성도가 나타난 분획의 pH를 등전점으로 결정하였다.

9. 열안정성 관찰

효소 활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 ALP를 포함하는 효소원 100 μl를 4°C, 15°C, 25°C, 37°C, 50°C, 65°C에서 10분간 배양한 후 기질 100 μl (10 mM p-nitrophenyl phosphate)를 첨가하여 각 온도에서 15분간 반

응시켰다. 반응 후 0.1 M NaOH 1 ml을 첨가하여 분광광도계로 400 nm에서 흡광도를 측정하여 각 온도에 대한 활성도를 비교하였다.

10. Enzyme ditestion

1) Neuraminidase의 처리

Neuraminidase의 처리는 Willam과 Linda (1988)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 부분 정제된 중장 ALP 10 μg에 Neuraminidase (from *Clostridium perfringens*, 4.5 UI/ml; Sigma, USA)가 포함된 70 mM, pH 7.5 Tris-HCl 완충용액 300 μl를 첨가하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 배양 후 non-denaturing PAGE와 activity staining을 수행하여 처리전과 후를 비교하였다.

2) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PtdIns-PLC)의 처리

PtdIns-PLC의 처리는 Hoffmann-Blume 등(1991)에 의한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 부분 정제된 중장 ALP 10 μg에 PtdIns-PLC (from *Bacillus cereus*, 1.6 UI/ml; Sigma, USA)가 포함된 0.1 M, pH 5.0 acetate 완충용액 300 μl를 첨가하여 25°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 non-denature PAGE와 activity staining을 수행하여 처리전과 후를 비교하였다.

3) 기질 특이성 관찰

부분 정제된 효소의 기질 특이성을 관찰하기 위해 효소와 각 기질을 반응시킨 다음, 효소활성의 대사산물인 무기인의 농도를 측정하여 비교하였다. 무기인은 Fiske와 Subbarow (1925)의 방법에 의해 정량하였다. 그 방법은 다음과 같다. 부분 정제된 효소 250 μl에 각각의 기질 250 μl가 포함된 0.1 M, pH 9.5 Tris-HCl 완충용액을 첨가하여 20분간 반응시켰다. 반응 후 30% cold TCA 500 μl을 첨가하여 4,000×g에서 5분간 원심분리하고, 상층액에 10% ascorbic acid, 2.5% ammonium molybdate, 6 N sulfuric acid, 증류수가 각각 1 : 1 : 1 : 2로 혼합된 용액을 4 ml 첨가하여 37°C에서 2시간 배양하였다. 배양 후 분광광도계로 820 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 무기인의 양은 potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4, Yakuri, Japan)을 표준시약으로 정량그래프를 만들었으며, 실험결과 측정된 흡광도를 그래프에 대응시켜 그 양을 산출하였다. 이때 사용된 기질은 p-nitrophenyl phosphate (2 mM, Fluka, Swiss), adenosine 5′-monophosphae (2 mM, Sigma, USA), adenosine 5′-diphosphae (2 mM, Sigma, USA), adenosine 5′-triphosphae (5 mM, Sigma, USA), glucose 1-phosphate (2 mM, Sigma, USA), glucose 6-phosphate (2 mM, Sigma, USA), fructose 6-phosphate (2 mM, Sigma, USA), bis (p-nitrophenyl)phosphate (20 m, Sigma, USA), α-glycerophosphate (2 mM, Sigma, USA), 및 β-glycerophosphate (2 mM, Sigma, USA) 등이었다.

결 과

1. 중장 ALP의 분포

Fig. 1은 *Eisenia andrei* 중장 ALP의 분포를 나타내고 있

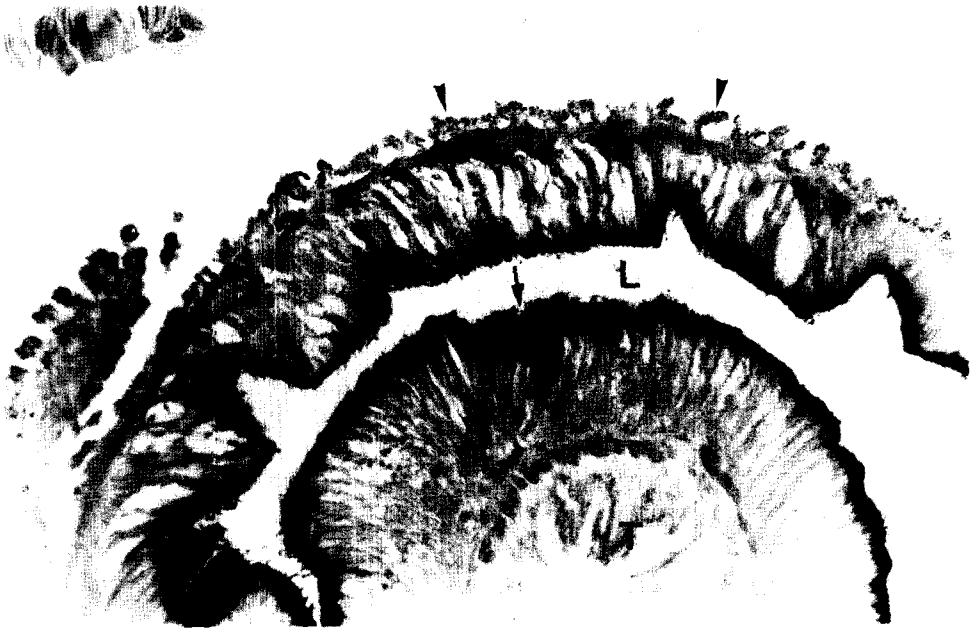

Fig. 1. Histochemical distribution of midgut ALP in the earthworm, *Eisenia andrei* (×200). C: chloragogue tissue; E: epithelium; L: lumen of midgut; T: typhlosolar region.

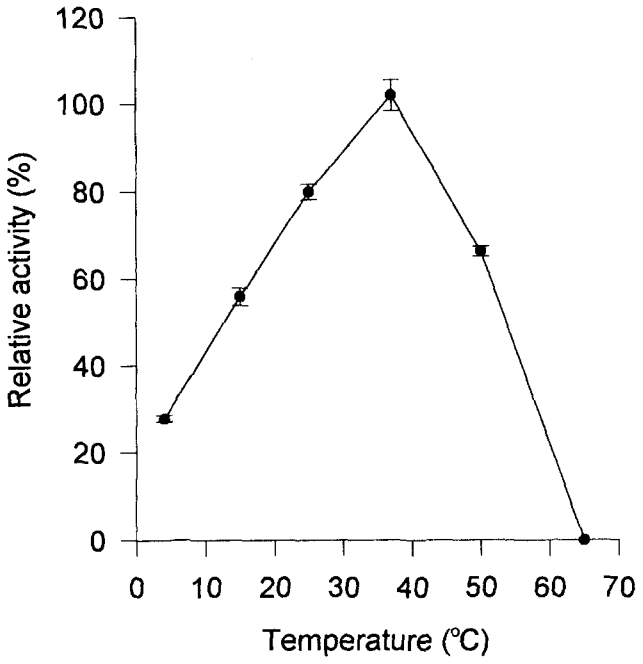

Fig. 2. Analysis of thermal stability of ALP activity in the midgut of the earthworm, *Eisenia andrei* in various temperature. The midgut ALP was preincubated for 10 min and then assayed using p-nitrophenyl phosphate as substrate for 15 min at the incubated temperature. The activity was expressed as the percent of maximal activity.

Table 1. Percent distribution of ALP activity in the midgut of *Eisenia andrei*

Chloragogue tissue	Epithelium
15.9 ± 8.1a	84.1 ± 8.1a

a The percent distributions are expressed as the mean ± S.D. for nine experiments and were calculated by (total activity-tissue activity) × 100 /total activity. The unit of total and tissue activity was nmol min^{-1}.

다. *Eisenia andrei*의 중장에서는 ALP 활성의 대부분이 장상피의 정상 부위(apical portion)에서 나타났으며(arrow), chloragogue tissue에서는 미세한 ALP 활성(head of arrow)이 관찰되었다. 그러나 typhlosolar region에서는 ALP 활성이 관찰되지 않았다. 중장의 총 ALP 활성 중 약 85%가 상피조직에 존재하고 있었으며, chloragogue tissue에서는 나머지 약 15%를 포함하고 있는 것으로 사료된다(Table 1).

2. 열안정성

온도가 효소활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 효소 활성도 측정시 배양온도를 변화시켜 중장 ALP의 활성을 측정한 결과, 중장 ALP의 활성은 온도가 상승함에 따라 37°C에서 최대 활성을 보였다. 그러나 37°C 이후는 온도가 상승함에 따라 ALP 활성은 급격히 감소하였으며, 65°C에서는 ALP 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 2).

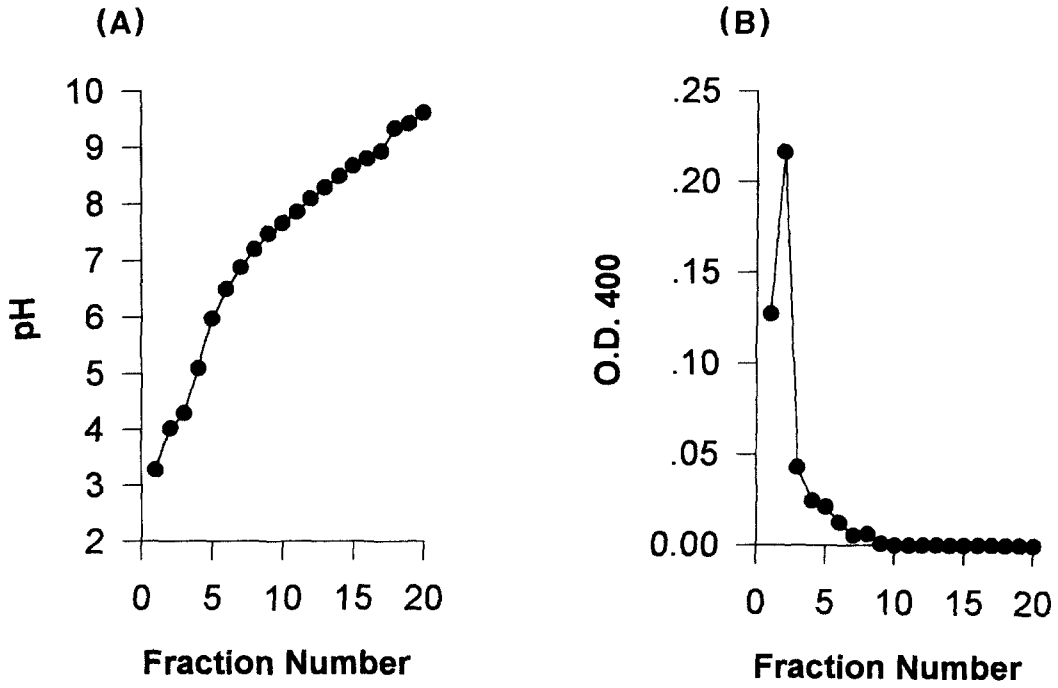

Fig. 3. Determination of pI by isoelctric focusing using Rotofor Cell (0.5% ampholyte, pH range 3-10). (A) Profile of pH gradient established after completing isoelectric focusing, indicating that pH gradient from 3.3 to 9.6 was properly distributed in each fraction. (B) Enzyme activity of each fraction recovered after isoelectric focusing, showing the distinct peak at the fraction number of 2.

3. 등전점 (isoelectric point, pI)

ALP의 등전점을 측정하기 위해 isoelectric focusing의 방법을 이용하여 Rotofor Cell (0.5% ampholyte, pH range 3-10)로 확인한 결과 등전점이 약 4.0-4.3으로 산성 단백질인 것으로 확인되었다 (Fig. 3).

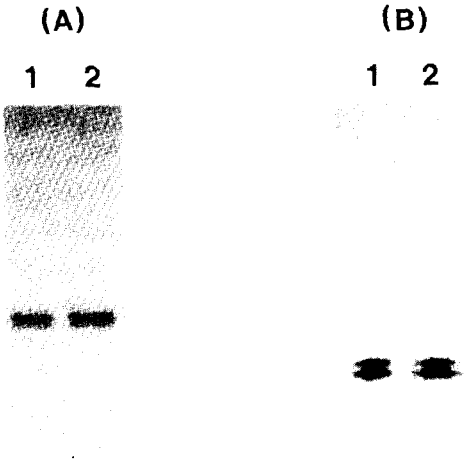

Fig. 4. Electrophoretic profile of secretory ALP isoenzymes before and after enzymatic cleavage by neuraminidase and PtdIns-PLC. (A) Treatment of neuraminidase. lane 1: control without neuraminidase; lane 2: treatment of neuraminidase. (B) Treatment of PtdIns-PLC. lane 1: control without PtdIns-PLC; lane 2; treatment of PtdIns-PLC.

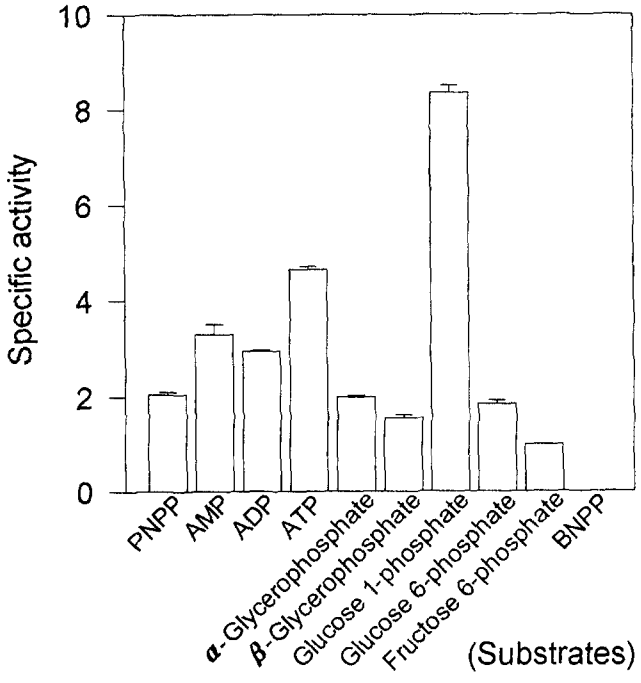

Fig. 5. Substrate specificities of secretory ALP isoenzymes from the midgut of *Esenia andrei*. The specific activity was expressed as nmol $min^{-1}mg^{-1}$ for triplicate determinations.

4. Enzyme digestion

Neuramnidase와 Phosphatidylinositol-specific phosphatase C (PtdIns-PLC)를 처리한 실험결과 neuraminidase와 PtdIns-PLC의 효소에 의해서 ALP의 활성은 영향을 받지 않았으며, gel 상에서의 ALP의 이동성에도 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 4).

5. ALP의 기질 특이성

부분 정제된 중장 ALP의 기질 특이성을 Fig. 5에 나타내었다. 부분 정제된 *Eisenia andrei* 중장 ALP는 p-nitrophenyl phosphate (PNPP), glucose 6-phosphate, adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-monophosphate (AMP), α-glycerophosphate 및 β-glycerophosphate 등의 기질에 비교적 높은 활성을 유지하였고 fructose 6-phosphate에서는 비교적 낮은 활성도를 나타내었다. 그러나 glucose 1-phosphate에 대해서는 PNPP 보다 4배 이상의 활성도를 나타내고 있어서 사용된 기질 중 최고의 활성도를 유지하였다. 한편 bis (p-nitrophenyl)phosphate (BNPP)는 전혀 분해하지 못하는 것으로 사료된다.

고 찰

지렁이 장에 존재하는 효소의 종류 및 isoform의 종류, 특성 등에 관한 연구는 주로 탄수화물 대사 (Prento 1987a, b), transmembrane transport (Dev and Vyas 1972, Prento 1987a, b), xenobiotics 대사 (Varute and More 1973, Stenersen and Oien 1981, Milligan 등 1986, Hans 등 1993, Park 등 1993) 등의 과정에 있어서 장상피와 chloragogue tissue의 생리학적인 중요성을 이해하기 위하여 수행되어졌다. 장내에 존재하는 여러 효소들 중에서 ALP는 상기한 다양한 생화학적 반응 모두에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 지렁이의 장 ALP는 glucogen 대사 (Prento 1987a, b) 및 organophosphate의 bioactivation (Park 등 1993) 과정에 관련되어 있으며, 장 상피를 통한 소화산물의 이동에도 직, 간접적으로 연관되어있는 것으로 사료된다 (Dev and Vyas 1972).

지렁이 중장의 ALP 분포는 종에 따라 상이하게 나타나고 있어서 *L. terrestris*는 chloragogue tissue에 Barogaster annandalei는 상피세포에 대부분의 ALP를 포함하고 있는 것으로 보고되었다. 본 연구결과 *Eisenia andrei*는 *B. annandalei*의 ALP 분포와 유사한 것으로 관찰되었으며 Epithelium-polarized (EP) type인 것으로 사료된다 (Fig. 1, Table 1).

포유류의 태반 ALP는 높은 열안정성을 가지고 있으며, 이러한 열안정성은 태반 ALP가 포함하고 있는 sialic acid side chain과 깊은 연관성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Harris 1989, Miura 등 1994). 또한, Jose 등 (1991)은 rat

의 골격 ALP 연구에서 골격 ALP는 4-37°C 사이의 온도에서는 비교적 안정하나 37°C 보다 높은 온도에서는 불안정하여 골격 ALP의 낮은 열안정성을 보고하였다. 본 연구에서 Eisenia andrei 중장 ALP의 온도에 대한 활성 변화는 37°C에서 최대 활성을 나타냈으며, 낮은 온도와 높은 온도 모두에서 비교적 낮은 열안정성을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 2). Rotofor Cell을 이용하여 isoelectro focusing에 의한 등전점(pI)을 관찰한 결과 중장 ALP의 등전점은 약 4.0-4.3 정도로 산성 단백질인 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 포유류 liver-type ALP의 등전점(4.5)과 유사하였다 (Sarciron 등 1991).

Wiliam과 Linda (1988)는 포유류의 몇가지 조직 특이성 ALP에 neuraminidase를 처리하고 처리전과 후의 이동성 변화를 전기영동의 방법으로 관찰하였다. 골격과 간장-특이성 ALP는 neuraminidase의 처리에 의해 이동성에 차이가 나타났으며, 그 정도는 ALP가 기원한 조직에 따라 차이가 있었다. 그러나 장 ALP에서는 이동성의 차이를 관찰할 수 없었다.

본 연구에서도 *Eisenia andrei* 중장 ALP에 neuraminidase를 처리한 결과 ALP 활성과 이동성의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 4A). 이러한 결과는 sialic acid side chain이 열안정성을 증가시킨다는 사실에 비추어볼 때 지렁이 중장 ALP는 sialic acid 잔기가 결여되어 있으며, 이로 인하여 낮은 열안정성을 갖는 것으로 생각된다. 또한 중장 ALP에 PtdIns-PLC를 처리한 결과에서도 ALP 활성과 이동성의 차이를 관찰할 수 없었으며(Fig. 4B), 이는 포유류의 장 ALP가 glycosylphosphatidylinositol (GlcPtdIns)에 anchor되어 분비된다는 Hoffmann-Blume 등(1991)의 보고와 상이하게 나타났다. 이러한 결과는 *E. andrei* 중장 ALP는 포유류의 장 ALP와는 달리 GlcPtdIns에 anchor되어 있지 않은 상태로 장의 내강으로 분비되는 것으로 사료된다.

일반적으로 장 ALP는 다른 효소에 비해 비교적 넓은 범위의 기질 특이성을 갖는다(Jose 등 1991, Bingham 등 1992). 한 종류의 ALP isoenzyme이 갖는 기질의 특이성은 이 효소가 갖는 생리적 중요성과 큰 연관성을 가지고 있다. 본 연구 결과 지렁이 중장에서 분비되는 ALP는 AMP, ADP 및 ATP 등의 nucleotide를 다른 동물의 ALP보다 효과적으로 분해하는 것으로 나타났다(Say 등 1991). 특히 ATP를 기질로 하여서는 PNPP보다 2배 이상의 활성도를 나타내고 있었으며(Fig. 5), 이러한 사실은 이 효소가 에너지 대사에 관련된 인의 대사와 연관되어 있을 가능성을 시사해 주고 있다. Lumbricidae과에 속하는 또 다른 종인 *L. terrestris*의 중장은 매우 낮은 glucose 6-phosphatase 활성을 갖고 있으며 ALP가 이 효소의 역할을 대신하고 있는 것으로 보고된 바 있다(Prento 1987b). 이러한 사실은 중장 ALP가 탄수화물 대사와 밀접한 연관성을 갖고 있음을 나타내고 있다. 본 연구결과 *E. andrei*는 glucose 6-phosphate를 기질로 하여서는 다른 동물 종의 ALP와 비슷한 효소 활성을 유지하는 것으로 사료된다(Say 등 1991). 그러나 glucose 1-phosphate를 기질로 하여서는 매우 높은 활성도를 유지하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 지렁이 중장 ALP가 장의 내강으로 분비될 뿐만 아니라 chloragogue tissue에도 존재한다는 사실에 비추어 볼때 이 조직에 저장된 glycogen 분해에 깊이 연관되어 있을 것으로 사료된다. ALP가 높은 glucose 1-phosphate 활성을 갖고 있음으로써 glycogen으로 부터 분리된 glucose 1-phosphate로부터 인산기를 효과적으로 분해하여 glucose가 용이하게 chloragogue tissue로 부터 이동할 수 있게 하며, 생성된 인은 연속적인 glycogen 분해를 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 연구 결과는 다수의 ALP가 phosphodiesterase 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있으나(Coleman 1992) 상기 효소는 phosphodiester를 분해할 수 없는 것으로 나타났다. 장내로 분비되는 분비성 ALP는 음식물의 소화과정에서 생성되는 sugar phosphate, phospholipids 및 phosphorylated intermediate 등과 같은 biological signal molecule을 분해하여 비정상적 signal의 유입을 차단하는 역할을 하는 것으로 생각되고 있다(Hoffmann-Blume 등 1991). 본 연구 결과에 의해서는 위와 같은 분비성 ALP의 역할을 직접적으로 증명할 수는 없으나 지렁이 중장 내로 분비된 ALP가 phosphoprotein을 제외한 대부분의 phosphorylated macromolecule을 기질로 하여 비교적 높은 활성을 유지한다는 사실은 위와 같은 생리적 기능을 수행할 가능성을 뒷받침 해주고 있다.

사 사

이 논문은 1997학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

인 용 문 헌

Bingham, E.W., K. Garver and D. Powlen. 1992. Purification and properties of alkaline phosphatase in the lactating bovine mammalian gland. *Journal of Dairy Science*. **75** : 3394-3401.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72** : 248-254.

Chang, C.H. and F. Moog. 1972. Alkaline phosphatases of the chicken duodenum: Isolation and partial charcterization of the multiple forms of duodenal phosphatase in pre- and post-hatching stages. *Biochimica et Biophysica Acta*. **258** : 154-165.

Coleman, J.E. 1992. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21** : 441-483.

Dev, B. and I. Vyas. 1972. Histoenzymatic pattern of alkaline phosphatase in the different components of the alimentary canal of the common earthworm, *Barogaster annandalei* (Stephenson), and its possible physiological significance. *Acta Morphologica Neerlando-Scandina-*

vica. **9** : 365-369.

Dupuis, Y., S. Tardivel, Z. Porembska and P. Fournier. 1991. Effect of some alkaline phosphatase inhibitors on intestinal calcium trnsport. *International Journal of Biochemistry*. **23** : 175-180.

Fisher, E. and L. Molnar. 1992. Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworm. *Soil Biology & Biochemistry*. **24** : 1723-1727.

Fishman, W.H. 1974. Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *The American Journal of Medicine*. **56** : 617-650.

Fiske, C.H. and Y.P. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*. **66** : 375-400.

Hans, R.K., M.A. Khan and M.U. Beg. 1993. Glutathione-S-transferase activity in an earthworm (*Pheretima posthuma*) exposed to three insecticides. *Soil Biology & Biochemistry*. **97** : 1461-1466.

Harris, H. 1989. The human alkaline phosphatase: what we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta* **186** : 133-150.

Hirano, K., Y. Iiizumi, Y. Mori, K. Toyoshi, M. Sugiura and S. Iino. 1985. Role of alkaline phosphatase on phosphate uptake into brush border membrane vesicles from human intestinal mucosa. *The Journal of Biochemistry*. **97** : 1461-1466.

Hoffmann-Blume, E., M.B. Garcia Marenco, H. Ehle, R. Bublitz, M. Schulze and A. Horn. 1991. Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of intraluminal alkaline phosphatase of the calf intestine. *European Journal of Biochemistry*. **199** : 305-312.

Houk, E.J. and J.L. Hardy. 1984. Alkaline phosphatase of the *mosquito culextarsalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **78B** : 303-310.

Jose, C.S., C. Katia, P.M.F. Rosa, C. Pietro and A.L. Francisco. 1991. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochemica Biophysica Acta*. **1074** : 256-262.

Milligan, D.L., J.G. Babish and E.F. Neuhauser. 1986. Noninducibility of cytochrome P-450 in earthworm, *Dendrobaena veneta*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **85C** : 85-87.

Miura, M., Y. Sakagishi, K. Hata and T. Komoda. 1994. Differences between the sugar moieties of liver- and bone-type alkaline phosphatase: a re-evaluation. *Annals of Clinical Biochemistry*. **31** : 25-30.

Mulivor, R.A., V.L. Hannig and H. Harris. 1978. Developmental change in human intestinal alkaline phosphatase. Proceedings National Academy Science USA. **75** : 3909-3912.

Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis-I. Background and theory. Annals of New York Academy of Sciences. **121** : 321-349.

Park, S.C., H.W. Park and T.J. Smith. 1996. Expression of alkaline phosphatase during embryonic development and immature stages of the earthworm, *Eisenia andrei*. *Soil Biology & Biochemistry*. **22** : 729-730.

Park, S.C., T.J. Smith and M.S. Bisesi. 1990. Hydrolysis of bis (4-nitrophenyl)phosphate by the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Soil Biology & Biochemistry*. **24** : 873-876.

Park, S.C., T.J. Smith and M.S. Bisesi. 1992. Activities of phosphomonoesterase and phosphodiesterase from *Lumbricus terrestris*. *Soil Biology & Biochemistry*. **24** : 873-876.

Park, S.C., T.J. Smith and M.S. Bisesi. 1993. Bioactivation of Bis (p-nitrophenyl)phosphate by phosphoesterases of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Drug and Chemical Toxicology*. **16** : 111-116.

Prento, P. 1987a. Blood sugar, sugar metabolism and related enzymes in the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **86B** : 333-341.

Prento, P. 1987b. Distribution of 20 enzymes in the midgut region of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L., with particular emphasis on the physiological role of the chloragogue tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **87A** : 135-142.

Register, T.C. and R.E. Wuthier. 1984. Effect of vanadate, a potent alkaline phosphatase inhibitor, on ^{45}Ca and ^{32}Pi uptake by matrix vesicle-ebriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*. **259** : 3511-3518.

Roubaty, C. and P. Portmann. 1988. Relation between intestinal alkaline phosphatase activity and brush border membrane transport of inorganic phosphate, D-glucose, and D-glucose-6-phosphate. *European Journal of Physiology*. **412** : 482-490.

Sarciron, M.E., W. Hamoud, G. Azzar and A.F. Petavy. 1991. Alkaline phosphatase from *Echinococcus multilocularis*: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **100B** : 253-258.

Say, J.C., K. Ciuffi, P.M. Rosa, P. Ciancaglini and F.A. Leone. 1991. Alkaline phosphatase from rat osseous plate: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1074** : 256-262.

Soucek, D.A. and J.C. Vyas. 1984. Some properties of acid and alkaline phosphatase from boar sperm plasma membrane. *Biology of Reproduction* **31** : 687-693.

Stenersen, J. and N. Oien. 1981. Glutathion S-transferase in the earthworms (Lumbricidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. **69C** : 243-252.

Tenenhouse, H.S., Schiver, C.R. and Vizel, E. J. 1980. Alkaline phosphatase activity does not mediate phosphate transport in the renal-cortical brush border membrane. *The Biochemical Journal*. **190** : 473-476.

Tojyo, T. 1984. Developmental changeover on rat duodenal alkaline phosphatase. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **77B** : 437-441.

Varute, A.T. and N.K. More. 1973. Lysosomal acid hydrolase in the chloragogen cells of earthworms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **45A** : 608-635.

William, E. M.D. Schreiber and Linda C. Sadro, B. Sc. 1988. Agarose gel patterns of alkaline phosphatase isoenzymes before and after treatment with neuraminidase. *American Journal of Clinical Phathology*. **89** : 181-186.

Yusufi, A.N.K., M.G. Low, S.T. Turner and T.P. Dousa. 1983. Selective removal of alkaline phosphatase from renal brush-border membrane and sodium-dependent brush border membrane transport. *The Journal of Biological Chemistry*. **258** : 5695-5701.